

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : **06-305901**

(43)Date of publication of application : **01.11.1994**

(51)Int.Cl.

A01N 1/02

(21)Application number : **05-099775**

(71)Applicant : **KAWAMURA AKIO**

(22)Date of filing : **26.04.1993**

(72)Inventor : **KAWAMURA AKIO**

(54) PERFUSION LIQUID FOR ROOM TEMPERATURE PRESERVATION AND PRESERVATION METHOD USING THE SAME LIQUID

(57)Abstract:

PURPOSE: To provide a perfusion liquid enabling the preservation of transplantation organs, etc., at a room temperature while keeping the metabolism and provide a process for the preservation of organs, etc., at a room temperature using the perfusion liquid.

CONSTITUTION: The perfusion liquid for the preservation of organs at a room temperature is composed of 0.1-10 (W/V)% of a perfluorocarbon compound for oxygen transfer, 1-20mmol/L of glucose, 10-200U/L of insulin, 0.1-5mmol/L of allopurinol, 1-10mg/L of PEG-modified SOD, 1-10mmol/L of adenosine, 1-20mg/L of dexamethasone, 1-5 (W/V)% of hydroxyethylated starch, 140-145mEq/L of sodium ion, 2-6mEq/L of potassium ion and 90-95mEq/L of chloride. The perfusion liquid has a pH adjusted to 7-8 which is close to that of extracellular fluid and an osmotic pressure of 300-340 mOsm/L to prevent the edema of the tissue. The perfusion liquid is oxygenated and perfused to an organ under a perfusion pressure of 60-100mmHg to preserve the organ at a room temperature.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 09.02.2000

[Date of sending the examiner's decision of rejection] 04.04.2002

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

* NOTICES *

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.**** shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Industrial Application] This invention relates to perfusate useful although a transplant etc. is saved under a room temperature, and the method of saving a transplant etc. under a room temperature using this perfusate.

[0002]

[Description of the Prior Art] Progress of the preservation technique of the organ for an organ transplantation in recent years is remarkable, and the advance of a preservation technique is promoting the spread of kidney transplantations increasingly. There are low-temperature simple dip coating [Lancet, 2, and 1219-1222 (1969)] and a low-temperature perfusion method [Lancet, 2, and 536 (1967)] in organ Conservation Act adopted clinically. These approaches make the metabolic turnover of a transplant usually control by preservation under 0-10-degree C low temperature, and enable preservation of long duration.

[0003]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] However, in order to make the metabolic turnover of a transplant once control at the time of preservation under low temperature, there is [whether the function (metabolic turnover) of a preservation organ is reproducible, and] a problem at the time of transplantation, and the evaluation approach is not established, either. Moreover, the failure to the transplant by preservation under low temperature is also supposed that examination is required.

[0004] Then, the preservation and the perfusion approach under a room temperature are examined as an approach of saving, making a transplant metabolize. For example, by the collection of the 28th Japanese Society for Artificial Organs convention drafts, No.192, and the approach indicated by p120 (September, 1990), if supply of oxygen and a substrate is made proper, it is expected that preservation of long duration is attained.

[0005] moreover, the various reports of the store method of the kidney under the room temperature using perfluorocarbon or liver have already been carried out (JP,55-51016,A --) Proceedings of the Xth international congress for nutrition : Symposium on perfluorochemical artificial blood, Kyoto 1975, 187-201, Nihon Gekagakukai Zasshi (J. Jap.Surg.Soc.), 74 (5), 397 [1973] etc.

[0006] Then, the purpose of this invention is offering store methods, such as an organ under the perfusate which can save a transplant etc., and a room temperature, having the organ preservation operation which was further superior to the conventional thing, and maintaining a metabolic turnover under a room temperature.

[0007]

[Means for Solving the Problem] As a result of repeating research that the above-mentioned purpose should be attained, this invention person used the perfluorocarbon compound as the base element, found out having the organ preservation operation excellent in the perfusate which consists of the following specific presentation (it has the presentation of extracellular fluid), and the method of saving an organ under a room temperature using this perfusate, and completed this invention.

[0008] This invention Namely, perfluorocarbon (PFC) compound 0.1-10(w/v) %, A glucose 1 - 20 mmol/L, an insulin 10 - 200 U/L, Allopurinol 0.1 - 5 mmol/L, PEG-ized SOD1 - 10 mg/L, An adenosine 1 - 10 mmol/L, dexamethasone 1 - 20 mg/L, Hydroxyethyl starch (HES) 1-5(w/v) %, the sodium ion 140 - 145 mEq/L, The potassium ion 2 - 6 mEq/L And chloride ion 90 - 95 mEq/L It is perfusate which consists of a presentation and the pH is related with the perfusate for preservation under a room temperature 7-8, and whose osmotic pressure are 300 - 340 mOsm/L.

[0009] Moreover, the perfusate for preservation under a room temperature concerned is oxygenated, and it is related with the bottom store method of a room temperature of the organ characterized by flowing in by perfusion pressure 60 - 100mmHg.

[0010] It is inactive chemically, the perfluorocarbon compound used by this invention is excellent in oxygen solubility, and at a room temperature, especially if liquefied, it will not be limited. As a suitable example of this perfluorocarbon compound, the perfluoro hydrocarbon of carbon numbers 9-12, the perfluoro tertiary amine of carbon numbers 9-12, etc. are mentioned.

[0011] As an example of a perfluorocarbon compound For example, perfluoro cycloalkane, perfluoroalkyl cycloalkane, A perfluoro cyclohexane, a perfluoro decalin, a perfluoroalkyl decalin, A perfluoroalkyl tetrahydro pyran, a perfluoroalkyl tetrahydro furan, A perfluoro alkane, perfluoro tertiary alkylamine, Perfluoro-N and N-dialkyl cyclohexylamine, a perfluoroalkyl piperidine, a perfluoroalkyl morpholine, perfluoro adamantane, perfluoroalkyl adamantane, etc. are mentioned (refer to JP,50-69219,A). Moreover, a perfluoro-N-methyl par hydronalium quinoline, a perfluoro-N-methyl deca hydro isoquinoline, a perfluoro-4-MECHIRUOKUTA hydro kino lysine, a perfluoro-3-MECHIRUOKUTA hydro kino lysine, a perfluoro-2-MECHIRUOKUTA hydro kino lysine, a perfluoro-1-MECHIRUOKUTA hydro kino lysine, a perfluoro-9a-MECHIRUOKUTA hydro kino lysine, a perfluoro-4-ECHIRUOKUTA hydro kino lysine, etc. are illustrated as a desirable perfluorocarbon compound.

[0012] The concentration of a perfluorocarbon compound is 0.1 in perfusate concerned -10(w/v) %, and is 1-5(w/v) % more suitably.

[0013] the oxygen solubility of the perfluorocarbon compound used in this invention -- general -- 36 degrees C of solution temperature -- setting -- 40-60(v/v) % -- it is 45-55(v/v) % preferably.

[0014] The perfluorocarbon compound concerned is used for the purpose of the oxygen transport of perfusate, and organ preservation is presented with it in the condition of containing oxygen in high concentration. Therefore, use is presented with a perfluorocarbon compound, dissolving oxygen in high concentration beforehand, or dissolving oxygen more preferably at the time of use.

[0015] In this invention, a perfluorocarbon compound is the oil-in-water emulsion which it was used with the gestalt of an emulsion and the perfluorocarbon compound distributed underwater suitably.

[0016] A macromolecule system nonionic surfactant, phospholipid, etc. are used as an emulsifier. As a macromolecule non-ion system surfactant, the thing of molecular weight 2,000-20,000 is suitable, for example, a polyoxyethylene-polyoxypropylene copolymer, polyoxyethylene fatty acid ester, a polyoxyethylene-castor-oil derivative, etc. are mentioned. Moreover, yolk phospholipid, soybean phosphatide, etc. are mentioned as phospholipid. An emulsifier is added so that it may become 1 in perfusate concerned - 5(w/v) %.

[0017] Furthermore by request, the fatty acids of carbon numbers 8-22 (preferably carbon numbers 14-20) or these salts [example:alkali-metal salts (sodium salt, potassium salt, etc.), monoglyceride], etc. that are accepted physiologically can be added as an emulsification adjuvant. Specifically, a caprylic acid, a capric acid, a lauric acid, a myristic acid, a palmitic acid, stearic acid, behenic acid, palmitoleic acid, oleic acid, linolic acid, arachidonic acids, those sodium, potassium salt, or those monoglyceride is mentioned. An emulsification adjuvant is added so that it may become 0.001 in perfusate concerned - 0.1(w/v) %.

[0018] Use of the isotonizing agent like glycerol is still more unnecessary as a result.

[0019] The approach of a publication etc. is illustrated by JP,52-96722,A, JP,58-225013,A, etc. that what is necessary is just to perform preparation of an emulsion by the well-known approach conventionally.

[0020] It mixes in order of arbitration, and the emulsion concerned rough-emulsifies each component, and is prepared by homogenizing so that particle diameter may be set to 0.3 micrometers or less with a suitable emulsifier (for example, MANTON gaulin mold emulsifier).

[0021] the perfusate for preservation under a room temperature of this invention -- setting -- as the presentation of those other than perfluorocarbon (emulsion) -- a glucose 1 - 20 mmol/L, an insulin 10 - 200 U/L, allopurinol 0.1 - 5 mmol/L, PEG-ized SOD1 - 10 mg/L, an adenosine 1 - 10 mmol/L, dexamethasone 1 - 20 mg/L, hydroxyethyl starch 1-5(w/v) %, the sodium ion 140 - 145 mEq/L, and the potassium ion 2 - 6 mEq/L And chloride ion 90 - 95 mEq/L it is . especially -- desirable -- a glucose 5 - 15 mmol/L, an insulin 20 - 100 U/L, allopurinol 0.5 - 3 mmol/L, PEG-ized SOD3 - 7 mg/L, an adenosine 3 - 7 mmol/L, dexamethasone 5 - 10 mg/L, hydroxyethyl starch 2-4(w/v) %, the sodium ion 140 - 145 mEq/L, and potassium ion about 4 mEq/L And chloride ion about 93 mEq/L it is .

[0022] In the perfusate concerned, a glucose is used as an energy source of an organization, and also in order to maintain osmotic pressure to coincidence, it is used. Moreover, the insulin corresponding to this is also added.

[0023] Allopurinol and PEG-ized SOD are used as an active oxygen scavenger. Superoxide dismutase (SOD) is made to carry out the chemical bond of the polyethylene glycol (PEG) to PEG-ized SOD here (refer to JP,62-115280,A).

[0024] Dexamethasone is used as a film stabilizing agent.

[0025] As for hydroxyethyl starch, about 200,000 to 300,000 thing is illustrated preferably about 10,000 to 350,000 molecular weight. Moreover, 0.4 to about 0.7 are illustrated as whenever [permutation].

[0026] Amino acid can also be used as a substrate in case a failure kidney is conditioning(ed) in addition to the above-mentioned component. Furthermore, the buffer solution can also be used and HEPES etc. is specifically illustrated.

[0027] The perfusate of this invention sets to pH 7-8, in order to bring close with extracellular fluid, and in order to prevent the edema of an organization, it is taken as osmotic pressure 300 - 340 mOsm/L. It is desirable that they are especially pH 7.4 [about], and osmotic-pressure about 320 mOsm/L.

[0028] Especially the process of the perfusate of this invention is not limited. The perfusate of this invention can be prepared by mixing with the above-mentioned component suitably.

[0029] Next, the bottom store method of a room temperature of the organ of this invention is an approach of saving organs, such as a transplant, under a room temperature (10-30 degrees C, preferably about 24 degrees C), by oxygenating the perfusate concerned and flowing in by perfusion pressure 60 - 100mmHg.

[0030] Oxygenation of perfusate can be performed by well-known technique. In this invention, it is desirable to oxygenate by the bubbling method, a membrane oxygenator method, etc.

[0031] In order to protect an organ from the physical hazard by perfusion and to maintain supply of sufficient oxygen or a substrate, it is required to set perfusion pressure to 60 - 100mmHg. It is because the angiopathy of a preservation organ etc. will be caused if the flow rate of perfusate becomes that perfusion pressure is less than 60 mmHgs inadequate and 100mmHg is exceeded on the other hand.

[0032] According to this condition, the perfusate concerned can supply oxygen by 450 or more mmHgs of oxygen tension to the bottom of a room temperature.

[0033] As an organ used as contrast of the store method of this invention, the kidney or liver in an organ transplantation etc. is illustrated.

[0034]

[Effect of the Invention] Since according to the perfusate for preservation under a room temperature of this invention the stable perfusion pressure is maintained and sufficient oxygen can be supplied, under a room temperature (10-30 degrees C, preferably about 24 degrees C), a long time (about 1 - 20 hours) can be covered, and a transplant can be saved and flowed in.

[0035] Moreover, it becomes possible by saving under a room temperature to maintain without controlling the metabolic turnover of a transplant. Therefore, viability of a preservation organ It has the advantage that it can know before transplantation. Namely, viability of the organ under preservation The long duration preservation to a limitation is attained acting as a monitor continuously by various

detection method. For example, it is viability of the preservation kidney by detection method simple [extent of urination, a urinary color tone, Urine pH and the sodium in urine, a potassium value, etc.], when saving the kidney, and quick etc. It becomes possible to judge.

[0036] Furthermore, the conditioning effectiveness of a preservation organ or the organ which received the failure is in one to perform bottom Conservation Act of a room temperature. According to the bottom store method of a room temperature of the organ using the perfusate of this invention, it becomes possible to conditioning the organ of a mammals animal including the Homo sapiens who received the failure by ***** or cooling in the good condition.

[0037]

[Example] Although an example and the example of an experiment are given in order to explain this invention to a detail further, this invention is not limited at all by these.

[0038] Example 1 hydroxyethyl starch and allopurinol (for A liquid), a glucose, a sodium chloride, butanoic acid sodium, and a potassium dihydrogenphosphate (for B liquid) were respectively dissolved in purified water. A liquid and B liquid were mixed, and the adenosine was added and it dissolved. Each water solution of HEPES, magnesium sulfate, amino acid preparation, and Fosmicin was added. The sodium-hydroxide solution adjusted pH to 7.4. After doubling the whole quantity, pressure filtration was carried out with the membrane filter of 0.20 micrometers of apertures. Perfluoro tributylamine (trade name FC-43, Green Cross Corp. make), dexamethasone, an insulin, and PEG-ized SOD were added in sterile. The last presentation becomes as it is shown in Table 1.

[0039]

[Table 1]

灌流液の組成（細胞外液）

成 分	1 L 当りの組成
NaCl	93 mmol
乳酸ナトリウム	27 mmol
KH ₂ PO ₄	4 mmol
MgSO ₄ · 7H ₂ O	3 mmol
グルコース	11 mmol
アミノ酸	0.75 g
HEPES（緩衝液）	25 mmol
アロプリノール	1 mmol
PEG-SOD	5 mg
アデノシン	5 mmol
デキサメタゾン	8 mg
インシュリン	50 U
ホスホマイシンナトリウム	0.66 mmol
ヒドロキシエチル澱粉（HES）	30 g
FC-43	30 g

室温下でNaOHによりpH7.40に調整

最低値Na : 140～145 meq/L, K : 4 meq/L,

Cl : 93 meq/L, 浸透圧 : 320 mosm/L

[0040] The experiment shown below was conducted using the perfusate of example of experiment 1 example 1.

** The laboratory animal and the nephrectomy method laboratory animal were used after breeding a rabbit (a Japanese white kind and sex) with a weight of 2.5-3.5kg within a fixed period cage. From the jug vein, anesthesia was introduced by intravenous injection of thiamylal sodium 20 - 25 mg/kg, and heparin sodium 100 unit / kg, and was maintained by anesthesia. After abdomen median incision, insertion immobilization of the catheter (TERUMO CORP. make) of outer-diameter 5Fr was carried out, and it considered as the urine test root at the ureter. Next, the renal artery and the renal vein were exfoliated, the renal vein was cut after inserting the catheter of 5Fr(s) in a renal artery, and it washed by 4-degree C lactated Ringer's solution (heparin 5000 unit / 500ml). It connected with the perfusion circuit shown in drawing 1 after measuring the weight of a kidney.

[0041] ** In the perfusion circuit and the perfusion condition a. perfusion circuit diagram 1, in the

shaking thermostat 1, the perfusate reservoir 3 containing the perfusate 2 of an example 1 is laid, and the temperature of perfusate 2 is held uniformly. It is pumped up by the roller pump 5 through Rhine 4, oxygenation of perfusate 2 is performed by membrane oxygenator 6 [HSO-03, MERASHIROKKUSU-S (trademark), and **** medical department company make], and the perfusate 2 in the perfusate reservoir 3 is supplied to the air trap 8 equipped with the pressure gage 7. The perfusate 2 in an air trap 8 is supplied to the extraction kidney 10 immersed in the perfusate 2 in the organ chamber 9 through artery Rhine 11 connected to the renal artery. A part of supplied perfusate 2 is filtered by the extraction kidney 10, uptake is carried out to a measuring cylinder 13 through a tube 12 as urine, and residual perfusate 2 is collected by the perfusate reservoir 3 through Rhine 14.

[0042] b. It oxygenated by the bubbling method which blows direct oxygen into the perfusate reservoir 3, and changed into the approach of using the membrane oxygenator of a hollow fiber mold from the middle at the oxygenating method beginning. By the bubbling method, the porous tube was immersed into the perfusate 2 of the perfusate reservoir 3, and the flow rate of pure oxygen was adjusted so that oxygen tension might not be set to 150 or less mmHgs. Moreover, the used membrane oxygenators 6 are 2, priming volume 20ml, and maximum stream flow 300 ml/min 0.3m of film surface products, and cover silicon hollow fiber of the bore of 200 micrometers, and 100 micrometers of thickness with polycarbonate resin in 3000 bundles. The oxygen flow rate was made into 1.0 L/min.

[0043] c. the need for preventing damage by the perfusion in perfusion pressure and the perfusion approach perfusion preservation, and maintaining a metabolic turnover -- the group of 50mmHg and 80mmHg(s) was examined in order to examine suitable perfusion pressure to supply sufficient oxygen and a sufficient substrate. It flowed in till 12 hours and perfusate was exchanged every 6 hours.

[0044] ** The experimental group experimental group was divided into the following six groups by ***** time amount and perfusion pressure.

I group: Perfusion pressure 50mmHg, a ***** 0-minute group (n= 5)

II group: Perfusion pressure 80mmHg, a ***** 0-minute group (n= 6)

III Group: Perfusion pressure 80mmHg, ***** 30-minute group (n= 6)

It was left in intraperitoneal one for 30 minutes after arterial blood style cutoff, and washed after that.

IV group: Perfusion pressure 80mmHg, a ***** 35-minute group (n= 8)

It was left in intraperitoneal one for 35 minutes after arterial blood style cutoff, and washed after that.

V group: Perfusion pressure 80mmHg, a ***** 40-minute group (n= 6)

VI group: The 24-hour cooling (4 degrees C) preservation group in UW liquid (n= 6)

Cannulation was enforced with exfoliation of a kidney by the same actuation as other groups, simple immersion was carried out into UW liquid cooled at 4 degrees C from immediately after the renal artery hemostasis, and bottom perfusion of a room temperature was performed by perfusion pressure 80mmHg after preservation of 24 hours till 12 hours. An I-II group is positioned as examination of the possibility of bottom perfusion Conservation Act of a room temperature, and control of III - VI group while determining suitable perfusion pressure. Moreover, III - VI group is positioned as what examines the possibility of a functional judging and conditioning.

[0045] ** Inspection-item and measuring method 1 perfusion rate : the calibration-curve graph by the display graduation of the roller pump 5 (MP-101, the Tokyo science equipment company make) with a flow regulation function was created, and the flow rate was measured.

2) Perfusion pressure : the pressure gage 7 (minimum scale 5mmHg, Aneroid Sphygmomanometer, and NITIRIN shrine make, 0 - 500 mmHg) was installed in the air trap 8, and it acted as the monitor continuously.

3) Perfusate gas analysis (pH, oxygen tension, carbon dioxide partial pressure) : it measured with the full automatic analyzer (ABL-30, product made from Radiomet).

4) Urine volume in every 2 hours : it measured using the measuring cylinder 13 (Pyrex shrine make) with a capacity of 20ml.

5) Urine pH, the electrolyte in urine (sodium, potassium value) : Urine pH is a full automatic analyzer (ABL-30), and measured the electrolyte in Hitachi 7150 (made in Hitachi).

6) Weight change of the kidney before and behind perfusion : it measured using the base type weighing

capacity meter (product made from Yamato) of 1g of minimum scales.

7) Pathology histological inspection of a kidney : it observed by hematoxylin-and-eosin (HE) dyeing and enzyme histochemistry dyeing at the time of perfusion termination. The latter examined alkaline phosphatase (aluminum-P), acid phosphatase (Ac-P), lactate dehydrogenase (LDH), succinic dehydrogenase (SDH), and gamma glutamyl transpeptidase (γ -glutamyl transpeptidase).

In addition, all numeric values were expressed with average**SD, significant difference assay was performed in unpaired t test (significant difference assay 2 between groups with which populations differ), and less than 5% of level of significance was made into those with a significant difference.

[0046] [Result]

The initial perfusion rate of I group was a 0.91 ± 0.01 ml/min/g kidney. However, finally it fell by about 1/with the 0.31 ± 0.27 ml/min/g kidney by the rise of circuit internal pressure during progress 3. Weight change of a kidney increased an average of 19.2%. The perfusion by 12 hours of three examples became impossible by the rise of circuit internal pressure among five examples. On the other hand, urination appeared ignited by the rise of circuit internal pressure. However, accommodation of urination and circuit internal pressure was poor in all examples, and continuation of an experiment was difficult.

[0047] It is a 1.58 ± 0.13 ml/min/g kidney and, as for the initial flow rate of II group, the inside of perfusion also maintained the almost fixed flow rate. pH of perfusate showed the 7.40 order of the set point mostly, and according to extent and state of preservation of urination, some change is $7.33 \pm \text{pH}$ and the highest in the minimum of a certain thing, and stopped at fluctuation of the range of $7.47 \pm \text{pH}$. Although the oxygen tension of perfusate was changed between 465.8mmHg and 850.0mmHg(s), it was not less than 400mmHg. The outflow of urine more transparent than immediately after perfusion initiation was accepted in all examples, and fixed urination was accepted through all progress. Although urinary pH showed $6.55 \pm 0.14 \pm \text{pH}$ of the minimum value 6 hours after, it was increased gradually after that. For 4 hours after, the sodium value in urine is the minimum 55.0 ± 22.9 mEq/L. It increases gradually henceforth and is 113.7 ± 21.7 mEq/L in the 12th hour. It was shown. The potassium value in urine is 50.5 ± 6.4 mEq/L in 2 hours of the beginning. A peak price is shown, and it decreases henceforth and is 19.3 ± 9.0 mEq/L in the 12th hour. It became. the weight of an extraction kidney -- immediately after perfusion initiation -- it is -- 15-19g -- it is -- the inside of six examples -- three examples -- weight -- it decreased by two examples not changeful at an increment and one example. The average weight rate of increase was $+8.7 \pm 11.1\%$. When histological change was seen by hematoxylin eosin staining, construction of a glomerulus was kept good and did not accept the view of flattening or omission in a renal tubule epithelium, either. Moreover, in enzyme histochemistry dyeing, the dark stain of the enzyme reaction is carried out to a purplish red color into the cell of a renal tubule by aluminum-P dyeing, and it is good viability. It was shown. This accepted the same view by other enzyme dyeing. The above results are results which summarized the example of all [six example]. However, as compared with five of these six examples of others one example, fluctuation of a urine presentation differed sharply. That is, the sodium value in urine was a low value clearly through all progress as compared with other five examples. Moreover, the potassium value in urine was a high price similarly, and this inclination was the same also about Urine pH.

[0048] III It is a 1.69 ± 0.20 ml/min/g kidney and, as for the initial flow rate of a group, the inside of perfusion also maintained the almost fixed flow rate. The flow rate at the time of termination became a 1.72 ± 0.1 ml/min/g kidney. pH of perfusate was changed between 7.31 - $7.40 \pm \text{pH}$. The oxygen tension of perfusate was not less than 400mmHg(s) like II group. Moreover, carbon dioxide partial pressure was changed between 2.4 - 6.1mmHg(s). In all examples, urination was soon accepted after initiation and fixed urination was accepted through all progress like II group. Urine pH reached $6.67 \pm 0.13 \pm \text{pH}$ of the minimum value, and was increased gradually after that in the 4th hour. The sodium value in urine is 50.7 ± 10.7 mEq/L of the minimum [after / 4 hours]. It increases gradually henceforth and is 122.0 ± 16.9 mEq/L in the 12th hour. It became. The potassium value in urine is also 56.0 ± 7.7 mEq/L of a peak price in 4 hours. It became and gradually decreased after that. The weight of an extraction kidney is immediately after perfusion initiation, and is 11-19g, perfusion order does not have one changeful example, either and an increment and one example decreased [four examples]. The average

weight rate of increase was $9.2 \pm 9.2\%$. In hematoxylin eosin staining, like [a glomerulus and a renal tubule] II group, although the construction was kept good, flattening of a renal tubule cell was accepted slightly. In enzyme histochemistry dyeing, the dye affinity in the cell of a renal tubule was almost the same as II group at aluminum-P dyeing. Moreover, other enzyme dyeing was the same.

[0049] Although urination was hardly accepted by two examples among eight IV groups but urination was accepted by one example, since the urine organization was almost the same as the presentation of perfusate, it considered as the example of omission and five examples were examined. The initial flow rate of five examples is a 1.85 ± 0.39 ml/min/g kidney, and the good flow rate was obtained through all progress. Fluctuation of 12 hours of pH of perfusate is II and III as $7.23 - 7.41 \pm \text{pH}$. Although there was an example which becomes a little low as compared with a group, most stopped above $7.30 \pm \text{pH}$. The oxygen tension of perfusate was not less than 400mmHg. Moreover, carbon dioxide partial pressure passed in $2.7 - 6.7$ mmHg and a low value. Although five examples accepted urination soon after perfusion, a flow is measured with II group, and it is III few. The almost same inclination as a group was accepted. It was $6.88 \pm 0.17 \pm \text{pH}$, and although Urine pH fell gradually till 6 hours and was set to $6.69 \pm 0.14 \pm \text{pH}$, it started to go up after that and was $6.91 \pm 0.16 \pm \text{pH}$ in the 12th hour. The sodium value in urine is 76.2 ± 16.5 mEq/L of the minimum [after / 4 hours]. Increasing gradually, although it became, 12 hours after reached 117.0 ± 10.9 mEq/L. The potassium value in urine is 42.6 ± 12.2 mEq/L in 2 hours of the beginning. The peak price was shown and it gradually decreased after that. As for the weight of an extraction kidney, it was one example for one eternal ** and an increment to be three examples, and to have decreased. The average rate of increase was $13.2 \pm 11.3\%$. With the results of III and IV group, the significant difference did not have any value between II groups. It is III although construction of a glomerulus was kept good in hematoxylin eosin staining. Flattening of the cell of a renal tubule was slightly accepted like the group. Moreover, omission of an epithelium were not accepted. In enzyme histochemistry dyeing, although the dye affinity was inferior by aluminum-P dyeing, it was not necessarily lost completely. This was the same inclination in other staining techniques.

[0050] Since urination was poor in three examples among six V groups and various urinary presentations were close to the presentation of perfusate, for analysis, urination examined only three good examples. That is, in ***** 40 minutes, the half kidney caused an irreversible malfunction. When the perfusion rate compared three good examples and three examples of a defect, in the initial flow rate, it was falling clearly with the 1.35 ± 0.14 ml/min/g kidney in the example of a defect to the good example having been a 1.92 ± 0.41 ml/min/g kidney, and the flow rate at the time of termination was a 1.51 ± 0.31 ml/min/g kidney in a 1.81 ± 0.40 ml/min/g kidney and the latter at the former. In three urination good examples, urination was soon accepted after perfusion initiation, and it is 10.4 ± 5.6 ml, and the total urine volume of 12 hours amounted to 50.0 ± 13.1 ml, and accepted many inclinations from other groups rather in 2 hours of the beginning. Although the urine pH of a good example was $6.95 \pm 0.22 \pm \text{pH}$, fell gradually till 6 hours and was set to $6.88 \pm 0.15 \pm \text{pH}$, it went up after that and $7.05 \pm 0.07 \pm \text{pH}$ and $7.00 \pm \text{pH}$ were exceeded in the 12th hour. this -- II group -- comparing -- being significant ($P < 0.05$) -- it was a high price. the sodium value in urine -- dispersion in three examples -- large -- 2 hours of the beginning -- 89.7 ± 44.4 mEq/L it was . Henceforth, it is 86.3 ± 31.5 mEq/L 4 hours after. 130.7 ± 17.6 mEq/L with the perfusate 12 hours after near [although restorative ** was shown a little / go up gradually and] a sodium presentation It became. That is, the breakdown of the resorption ability of a renal tubule was suggested. the potassium value in urine -- 2 hours of the beginning -- 35.7 ± 25.8 mEq/L it is -- after [12 hours] passing to about 1 law till 4 hours after and gradually decreasing henceforth -- 12.3 ± 7.6 mEq/L It fell. however, sodium and a potassium -- since any value had large dispersion, there was no significant difference with II group. By assay except one example with a comparatively good numeric value, the significant difference was accepted by 5% of level of significance. One eternal ** and the increment of change of the weight of an extraction kidney were two examples, and the average rate of increase was $7.7 \pm 5.6\%$. The whole change was slight, although construction of a glomerulus is maintained good and the renal tubule accepted flattening of a cell slightly in hematoxylin eosin staining of a good example. On the other hand, by aluminum-P dyeing

of the enzyme histochemistry dyeing, the dye affinity was very poor, in the cell of a renal tubule, it is only dyeing palely and the breakdown of the maintenance device of a cell membrane was shown. [0051] Although there were very many initial flow rates of six VI groups compared with a 2.88 ± 0.88 ml/min/g kidney and an II-V group ($P < 0.01$), since the kidney became light by dehydration during immersion preservation of 24 hours, the flow rate of this increases on count. therefore, the flow rate per kidney -- 26 - 28 ml/min it is -- it was almost the same as other groups. Moreover, although the flow rate at the time of termination turned into a 1.23 ± 0.20 ml/min/g kidney and a low flow rate since the weight of a kidney increased conversely, the flow rate per kidney was not different from the early flow rate per piece. pH of perfusate was changed between 7.28 - $7.42 \pm$ pH, and other groups and differences were not accepted. The oxygen tension of perfusate was not less than 400mmHg. Moreover, carbon dioxide partial pressure also passed in 2.6 - 6.8mmHg and a low partial pressure. In ****, as compared with the II-V group, there was much urine volume and this inclination was accepted through all progress ($P < 0.05$). It was $7.01 \pm 0.10 \pm$ pH, and Urine pH went up with time after that, and was $7.21 \pm 0.03 \pm$ pH in the 12th hour. All were high prices intentionally as compared with II group ($P < 0.01$). The sodium value in urine is 117.7 ± 20.2 mEq/L in 2 hours of the beginning. It was shown and increased with time after that. II group -- comparing -- being significant ($P < 0.01$) -- it was a high price. The potassium value in urine fell the value to the peak price with time like the sodium value for 2 hours. II group -- comparing - - being significant ($P < 0.01$) -- it was a low value. Weight change of an extraction kidney was very characteristic, and the example of all [six example] increased it sharply. The rate of increase was $+61.6 \pm 36.1\%$ in front of cooling preservation and between after ordinary temperature perfusion, and was $154.7 \pm 110.4\%$ just before the perfusion after cooling preservation, and between after perfusion. This was the weight increase by the decrease of weight by dehydration discovered during cooling preservation of 24 hours, and the Tsuguaki export-and-import blood vessel edema which appears in perfusion. In hematoxylin eosin staining, although the glomerulus is normal and flattening of a renal tubule cell was accepted in the part, the construction as the whole was kept good. An edema-like change [Tsuguaki export-and-import blood vessel] is characteristic at ****, and this was considered to be the important cause of the increment in kidney weight after perfusion termination. On the other hand, in aluminum-P dyeing of enzyme histochemistry dyeing, although it was inferior as compared with II group, the dye affinity almost equivalent to IV group was maintained.

[0052] The experimental result of the above I-VI group showed the following things. When considered as the perfusion pressure of 80mmHg for the stable oxygen supply and supply of a substrate, the possibility of the long duration preservation beyond 12 hours or it was shown. viability of the kidney saved by the simple and quick detection method of extent of urination, a urinary color tone, Urine pH, the sodium in urine, and a potassium value It was able to judge. From the result (fluctuation of Urine pH, the sodium in urine, and a potassium value showed the best value in 4 - 6 hours) of *****, it was suggested that conditioning of the failure kidney by this approach is possible, and the ***** limitation of a rabbit kidney was considered to be around 40 minutes.

[0053] The experiment shown below was conducted using the perfusate of example of experiment 2 example 1. The sow ($n = 5$) with a weight of 15-20kg was used for the laboratory animal. Anesthesia and oxygenation of perfusate were performed according to the example 1 of an experiment. After making an incision in the abdomen under general anesthesia, a portal vein, a hepatic artery, the liver upper part, and a liver lower inferior vena cava were intercepted, and from the portal vein, tubing was carried out and it flowed in. Hepatectomy enforcement was carried out 50%, having collected perfusate and carrying out [carried out tubing to the liver lower inferior vena cava] perfusion preservation of the liver as a closed circuit. The blood flow was resumed after flowing in for a total of 2 hours. inferior-vena-cava blood and portal vein blood -- a biotechnology pump -- outside -- the shin -- the autotransfusion was carried out to the vein. Hepatobiopsy was performed after [of a blood-flow restart] 30 minutes, and it inquired histologically. Moreover, it collected blood immediately after experiment termination and 24 hours and 48 hours after, and fluctuation of a liver function, and a coagulation and a fibrinolytic system factor was considered. Consequently, long-term survival was obtained in all examples. Construction of a liver is kept histological by hematoxylin eosin staining, and abnormalities were not accepted in hepatocyte,

either, but functional preservation of hepatocyte was proved also by aluminum-P dyeing. T. Bil (blood serum total bilirubin value) is 0.5 mg/dL. It changed below, GOT took the peak price 24 hours after (an average of 265), and GPT was 40 or less altogether during the observation period. Abnormalities were not accepted in coagulation and a fibrinolytic system factor, either. As mentioned above, the usefulness of liver protection of this perfusion method at the time of hepatectomy was shown.

[Translation done.]

* NOTICES *

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1] Perfluorocarbon compound 0.1-10(w/v) %, a glucose 1 - 20 mmol/L, An insulin 10 - 200 U/L, allopurinol 0.1 - 5 mmol/L, PEG-ized SOD1 - 10 mg/L, an adenosine 1 - 10 mmol/L, Dexamethasone 1 - 20 mg/L, hydroxyethyl starch 1-5(w/v) %, The sodium ion 140 - 145 mEq/L, and the potassium ion 2 - 6 mEq/L And chloride ion 90 - 95 mEq/L Perfusate for preservation under a room temperature to which it is perfusate which consists of a presentation, and the pH is characterized by 7-8, and osmotic pressure being 300 - 340 mOsm/L.

[Claim 2] The bottom store method of a room temperature of the organ characterized by oxygenating perfusate according to claim 1 and flowing into an organ by perfusion pressure 60 - 100mmHg.

[Translation done.]

(19)日本国特許庁(J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-305901

(43)公開日 平成6年(1994)11月1日

(51)Int.Cl.⁵

A 0 1 N 1/02

識別記号

庁内整理番号

9159-4H

F I

技術表示箇所

審査請求 未請求 請求項の数 2 O L (全 9 頁)

(21)出願番号 特願平5-99775

(22)出願日 平成5年(1993)4月26日

(71)出願人 593081431

川村 明夫

北海道札幌市豊平区月寒西二条10丁目2番
75号

(72)発明者 川村 明夫

北海道札幌市豊平区月寒西二条10丁目2番
75号

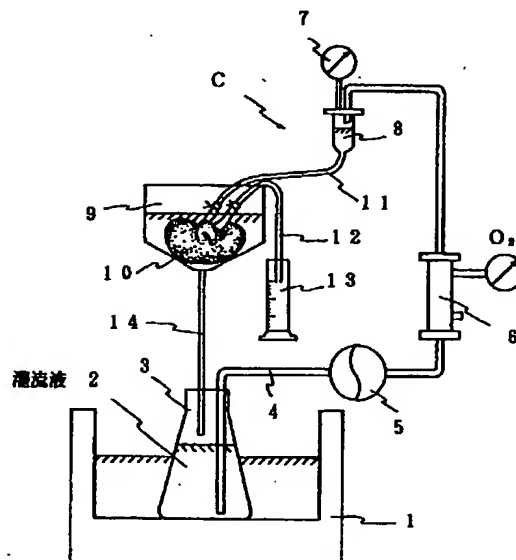
(74)代理人 弁理士 高島 一

(54)【発明の名称】 室温下保存用灌流液およびこれを用いた保存方法

(57)【要約】

【構成】 パーフルオロカーボン化合物0.1～10(w/v)%, グルコース1～20mmol/L、インシュリン10～200U/L、アロプリノール0.1～5mmol/L、PEG化SOD1～10mg/L、アデノシン1～10mmol/L、デキサメタゾン1～20mg/L、ヒドロキシエチル澱粉1～5(w/v)%, ナトリウムイオン140～145mEq/L、カリウムイオン2～6mEq/L および塩化物イオン90～95mEq/L を加え、そのpHを7～8、浸透圧を300～340mOsm/Lに調製して、灌流液2とする。

【効果】 灌流液2を酸素化した後、灌流圧60～100mmHgにて移植臓器10等を灌流することによって、代謝を維持するために充分な酸素を供給できるため、室温下で長時間にわたり移植臓器10等を保存・灌流することができる。したがって、低温下保存による移植臓器10等への障害がない。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 パーフルオロカーボン化合物0.1～10 (w/v)%, グルコース1～20 mmol/L、インシュリン10～200 U/L、アロプリノール0.1～5 mmol/L、PEG化SOD 1～10 mg/L、アデノシン1～10 mmol/L、デキサメタゾン1～20 mg/L、ヒドロキシエチル澱粉1～5 (w/v)%, ナトリウムイオン140～145 mEq/L、カリウムイオン2～6 mEq/L および塩化物イオン90～95 mEq/L の組成からなる灌流液であって、そのpHが7～8、浸透圧が300～340 mOsm/Lであることを特徴とする室温下保存用灌流液。

【請求項2】 請求項1記載の灌流液を酸素化し、臓器に灌流圧60～100 mmHgで灌流することを特徴とする臓器の室温下保存方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、移植臓器等を室温下にて保存するのに有用な灌流液、およびこの灌流液を用いて移植臓器等を室温下にて保存する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】近年において臓器移植に際しての臓器の保存技術の進展はめざましく、保存技術の進歩は、例えば腎臓移植の普及をますます促進している。臨床的に採用されている臓器保存法には、低温単純浸漬法〔Lancet, 2, 1219-1222 (1969)〕および低温灌流法〔Lancet, 2, 536 (1967)〕がある。これらの方法は、通常0～10℃の低温下での保存により移植臓器の代謝を抑制させて、長時間の保存を可能とする。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】しかし、低温下保存時に移植臓器の代謝を一旦抑制させるため、移植時に保存臓器の(代謝)機能が再現できるかどうか問題があり、その評価方法も確立されていない。また、低温下保存による移植臓器への障害も検討を要するとされている。

【0004】そこで、移植臓器の代謝を行わせつつ保存する方法として、室温下での保存・灌流方法が検討されている。例えば、第28回日本人工臓器学会大会予稿集, No.192, p120 (1990年9月)に記載されている方法では、酸素および基質の供給が適正になされれば長時間の保存が可能となるものと期待される。

【0005】また、パーフルオロカーボンを用いた室温下での腎臓あるいは肝臓の保存方法は既に各種報告されている(特開昭55-51016号公報、Proceedings of the Xth international congress for nutrition: Symposium on perfluorochemical artificial blood, Kyoto 1975, 187-201, Nihon Gekagakukai Zasshi (J. Jap. Surg. Soc.), 74(5), 397 [1973]等)。

【0006】そこで本発明の目的は、従来のものよりもさらに優れた臓器保存作用を有し、室温下で代謝を維持しながら移植臓器等を保存することができる灌流液、お

よび室温下での臓器等の保存方法を提供することである。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明者は、上記目的を達成すべく研究を重ねた結果、パーフルオロカーボン化合物を基本要素とし、下記の特定制成(細胞外液の組成を有する)からなる灌流液が優れた臓器保存作用を有すること、およびこの灌流液を用いて室温下で臓器を保存する方法を見出して本発明を完成した。

【0008】即ち本発明は、パーフルオロカーボン(FC)化合物0.1～10 (w/v)%, グルコース1～20 mmol/L、インシュリン10～200 U/L、アロプリノール0.1～5 mmol/L、PEG化SOD 1～10 mg/L、アデノシン1～10 mmol/L、デキサメタゾン1～20 mg/L、ヒドロキシエチル澱粉(HES) 1～5 (w/v)%, ナトリウムイオン140～145 mEq/L、カリウムイオン2～6 mEq/L および塩化物イオン90～95 mEq/L の組成からなる灌流液であって、そのpHが7～8、浸透圧が300～340 mOsm/Lである室温下保存用灌流液に関する。

【0009】また、当該室温下保存用灌流液を酸素化し、灌流圧60～100 mmHgで灌流することを特徴とする臓器の室温下保存方法に関する。

【0010】本発明で用いられるパーフルオロカーボン化合物は、化学的に不活性で、酸素溶解性に優れ、室温で液状のものであれば特に限定されない。かかるパーフルオロカーボン化合物の好適な例としては、炭素数9～12のパーフルオロ炭化水素、炭素数9～12のパーフルオロ第三級アミン等が挙げられる。

【0011】パーフルオロカーボン化合物の具体例としては、例えばパーフルオロシクロアルカン、パーフルオロアルキルシクロアルカン、パーフルオロシクロヘキサン、パーフルオロデカリン、パーフルオロアルキルデカリン、パーフルオロアルキルテトラヒドロピラン、パーフルオロアルキルテトラヒドロフラン、パーフルオロアルカン、パーフルオロターシャリーアルキルアミン、パーフルオロ-N、N-ジアルキルシクロヘキシルアミン、パーフルオロアルキルピペリジン、パーフルオロアルキルモルホリン、パーフルオロアダマンタン、パーフルオロアルキルアダマンタン等(特開昭50-69219号公報参照)が挙げられる。また、パーフルオロ-N-メチルパーヒドロキノリン、パーフルオロ-N-メチルデカヒドロイソキノリン、パーフルオロ-4-メチルオクタヒドロキノリジン、パーフルオロ-3-メチルオクタヒドロキノリジン、パーフルオロ-2-メチルオクタヒドロキノリジン、パーフルオロ-1-メチルオクタヒドロキノリジン、パーフルオロ-9a-メチルオクタヒドロキノリジン、パーフルオロ-4-エチルオクタヒドロキノリジン等も好ましいパーフルオロカーボン化合物として例示される。

【0012】パーフルオロカーボン化合物の濃度は、当該灌流液中0.1~10(w/v)%であり、より好適には1~5(w/v)%である。

【0013】本発明にて使用されるパーフルオロカーボン化合物の酸素溶解性は、一般に液温36℃において40~60(v/v)%、好ましくは45~55(v/v)%である。

【0014】当該パーフルオロカーボン化合物は、灌流液の酸素運搬を目的として用いられ、酸素を高濃度に含有する状態で臓器保存用に供される。従って、パーフルオロカーボン化合物は予め高濃度に酸素を溶解させておくか、より好ましくは使用時に酸素を溶解させながら使用に供される。

【0015】本発明において、パーフルオロカーボン化合物は乳剤の形態で使用され、好適にはパーフルオロカーボン化合物が水中に分散した水中油型乳剤である。

【0016】乳化剤としては高分子系非イオン性界面活性剤、リン脂質等が用いられる。高分子系非イオン系界面活性剤としては分子量2,000~20,000のものが好適であり、例えばポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレンコポリマー、ポリオキシエチレン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンヒマシ油誘導体等が挙げられる。また、リン脂質としては卵黄リン脂質、大豆リン脂質等が挙げられる。乳化剤は、当該灌流液中1~5(w/v)%となるように添加される。

【0017】さらに所望により、炭素数8~22(好ましくは炭素数14~20)の脂肪酸、またはこれらの生理的に受け入れられる塩(例:アルカリ金属塩(ナトリウム塩、カリウム塩等)、モノグリセライド等)等を乳化補助剤として加えることができる。具体的には、例えばカプリル酸、カプリン酸、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、ベヘン酸、パルミトレイン酸、オレイン酸、リノール酸、アラキドン酸、あるいはそれらのナトリウムまたはカリウム塩、もしくはそれらのモノグリセライド等が挙げられる。乳化補助剤は、当該灌流液中0.001~0.1(w/v)%となるように添加される。

【0018】さらにグリセロールの如き等張化剤の使用は結果として不要である。

【0019】乳剤の調製は従来公知の方法で行えばよく、例えば特開昭52-96722号公報、特開昭58-225013号公報等に記載の方法等が例示される。

【0020】当該乳剤は各成分を任意の順序に混合して粗乳化し、適当な乳化機(例えば、マントンゴーリン型乳化機)によって粒子径が0.3μm以下となるように均質化することによって調製される。

【0021】本発明の室温下保存用灌流液において、パーフルオロカーボン(乳剤)以外の組成としては、グルコース1~20mmol/L、インシュリン10~200U/L、アロプリノール0.1~5mmol/L、PEG化SOD 1~10mg/L、アデノシン1~10mmol/L、デキサメタ

ゾン1~20mg/L、ヒドロキシエチル澱粉1~5(w/v)%、ナトリウムイオン140~145mEq/L、カリウムイオン2~6mEq/Lおよび塩化物イオン90~95mEq/Lである。特に好ましくは、グルコース5~15mmol/L、インシュリン20~100U/L、アロプリノール0.5~3mmol/L、PEG化SOD3~7mg/L、アデノシン3~7mmol/L、デキサメタゾン5~10mg/L、ヒドロキシエチル澱粉2~4(w/v)%、ナトリウムイオン140~145mEq/L、カリウムイオン約4mEq/Lおよび塩化物イオン約93mEq/Lである。

【0022】当該灌流液において、グルコースは組織のエネルギー源として用いられ、同時に浸透圧を維持するためにも使用される。また、これに対応したインシュリンも加える。

【0023】アロプリノールとPEG化SODは活性酸素捕捉剤として用いられる。ここでPEG化SODとは、ポリエチレングリコール(PEG)をスーパーオキシドジスムターゼ(SOD)に化学結合させたものである(特開昭62-115280号公報参照)。

【0024】デキサメタゾンは膜安定化剤として用いられる。

【0025】ヒドロキシエチル澱粉は分子量1万~35万程度、好ましくは20万~30万程度のものが例示される。また、置換度としては0.4~0.7程度が例示される。

【0026】上記成分以外に、障害腎がconditioningされる時の基質として、アミノ酸類を使用することもできる。さらに、緩衝液も使用することができ、具体的にはHEPES等が例示される。

【0027】本発明の灌流液は、細胞外液により近づけるためにpH7~8とし、組織の浮腫を防ぐために浸透圧300~340mOsm/Lとする。特にpH約7.4、浸透圧約320mOsm/Lであることが好ましい。

【0028】本発明の灌流液の製法は特に限定されない。上記の成分を適宜混和することにより、本発明の灌流液を調製することができる。

【0029】次に、本発明の臓器の室温下保存方法は、当該灌流液を酸素化し、灌流圧60~100mmHgで灌流することにより、移植臓器等の臓器を室温下(10~30℃、好ましくは約24℃)で保存する方法である。

【0030】灌流液の酸素化は公知の手法により行うことができる。本発明においては、バブリング法、膜型人工肺法等により酸素化を行うことが好ましい。

【0031】臓器を灌流による物理的障害から保護し、かつ十分な酸素や基質の供給を維持するためには、灌流圧を60~100mmHgにすることが必要である。灌流圧が60mmHg未満であると、灌流液の流量が不十分となり、一方、100mmHgを超えると、保存臓器の血管障害等を来すからである。

【0032】この条件により、当該灌流液は、室温下に

において酸素分圧450mmHg以上で酸素を供給することができる。

【0033】本発明の保存方法の対照となる臓器としては、臓器移植における腎臓あるいは肝臓等が例示される。

【0034】

【発明の効果】本発明の室温下保存用灌流液によれば、安定した灌流圧を維持し、十分な酸素を供給できるため、室温下(10~30℃、好ましくは約24℃)で長時間(1~20時間程度)にわたり移植臓器を保存・灌流することができる。

【0035】また、室温下で保存することにより、例えば移植臓器の代謝を抑制せずに維持することが可能になる。従って、保存臓器のviabilityを移植前に知り得るという利点を有する。即ち、保存中の臓器のviabilityを各種検査法により連続的にモニターしながら、限界までの長時間保存が可能となる。例えば、腎臓を保存する場合には、利尿の程度、尿の色調、尿pHや尿中ナトリウム、カリウム値等の簡便かつ迅速な検査法等により、保存腎臓のviabilityを判定することが可能となる。

【0036】さらに、室温下保存法を行う目的の一つに、保存臓器や障害を受けた臓器のconditioning効果がある。本発明の灌流液を用いる臓器の室温下保存方法に

よれば、温阻血または冷却による障害を受けたヒトを含む哺乳類動物の臓器を良好な状態にconditioningすることが可能となる。

【0037】

【実施例】本発明をさらに詳細に説明するために実施例および実験例を挙げるが、本発明はこれらにより何ら限定されるものではない。

【0038】実施例1

ヒドロキシエチル澱粉およびアロプリノール(A液用)、グルコース、塩化ナトリウム、酪酸ナトリウムおよびリン酸二水素カリウム(B液用)を各々精製水に溶解した。A液およびB液を混合し、アデノシンを添加、溶解した。HEPES、硫酸マグネシウム、アミノ酸製剤、ホスミシンの各水溶液を添加した。水酸化ナトリウム溶液でpHを7.4に調整した。全量を合わせた後、孔径0.20μmのメンブランフィルターにて加圧ろ過した。パーフルオロトリブチルアミン(商品名FC-43、ミドリ十字社製)、デキサメタゾン、インシュリンおよびPEG化SODを無菌的に添加した。最終組成は表1のようになる。

【0039】

【表1】

灌流液の組成 (細胞外液)

成 分	1 L当りの組成
NaCl	93 mmol
乳酸ナトリウム	27 mmol
KH ₂ PO ₄	4 mmol
MgSO ₄ · 7H ₂ O	3 mmol
グルコース	11 mmol
アミノ酸	0.75 g
HEPES (緩衝液)	25 mmol
アロプリノール	1 mmol
PEG-SOD	5 mg
アデノシン	5 mmol
デキサメタゾン	8 mg
インシュリン	50 U
ホスホマイシンナトリウム	0.66 mmol
ヒドロキシエチル澱粉 (HES)	3.0 g
FC-43	3.0 g

室温下でNaOHによりpH7.40に調整

最低値Na : 140~145 mEq/L, K : 4 mEq/L,

Cl : 93 mEq/L, 浸透圧 : 320 mOsm/L

【0040】実験例1

実施例1の灌流液を用いて、以下に示す実験を行った。

① 実験動物と腎摘出法

実験動物は、体重2.5~3.5kgの家兎(日本白色種・雄雄)を一定期間ケージ内で飼育した後を用いた。麻酔は、耳静脈より、チアミラールナトリウム20~25 mg/kgとヘパリンナトリウム100単位/kgの静注により導入し、エーテル麻酔で維持した。腹部正中切開後、尿管に外径5Frのカテーテル(テルモ社製)を挿入固定し、採尿ルートとした。次に、腎動脈および腎静脈を剥離し、腎動脈に5Frのカテーテルを挿入後、腎静脈を切断し、4℃の乳酸リンゲル液(ヘパリン5000単位/500ml)で洗浄した。腎の重量を測定後、図1に示される灌流回路に接続した。

【0041】② 灌流回路と灌流条件

* a. 灌流回路

図1において、振盪恒温槽1内には実施例1の灌流液2の入った灌流液リザーバー3が載置され、灌流液2の温度は一定に保持されている。灌流液リザーバー3中の灌流液2は、ライン4を介してローラーポンプ5によって汲み上げられ、膜型人工肺6(HS0-03, メラシロックス-S(登録商標)、泉工医科社製)により灌流液2の酸素化が行われ、圧力計7を備えたエアートラップ8に供給される。エアートラップ8中の灌流液2は、臓器チャンバー9中の灌流液2に浸漬された摘出腎10に、腎動脈に接続された動脈ライン11を介して供給されている。供給された灌流液2の一部は、摘出腎10により濾過されて、尿としてチューブ12を介してメスシリンダー13に捕集され、残余の灌流液2は、ライン14を介して灌流液リザーバー3に回収される。

* 50

【0042】b. 酸素化法

最初は灌流液リザーバー3内に直接酸素を吹き込むバブリング法により酸素化を行い、途中からはhollow fiber型の膜型人工肺を使用する方法に変更した。バブリング法では、多孔性のチューブを灌流液リザーバー3の灌流液2中に浸漬し、酸素分圧が150mmHg以下にならぬように純酸素の流量を調節した。また、使用した膜型人工肺6は、膜面積0.3m²、priming volume 20ml、最大流量300ml/minで、内径200μm、膜厚100μmのシリコンhollow fiberを3000本束ね、ポリカーボネート樹脂で被覆したものである。酸素流量は1.0L/minとした。

【0043】c. 灌流圧と灌流方法

灌流保存における灌流による損傷を防ぎ、代謝を維持するための、必要十分な酸素や基質を供給するのに適切な灌流圧を検討する目的で、50mmHgと80mmHgの群について検討した。12時間まで灌流し、灌流液は6時間毎に交換した。

【0044】③ 実験群

実験群は温阻血時間と灌流圧により以下の6群に分けた。

I群：灌流圧50mmHg、温阻血0分群 (n=5)

II群：灌流圧80mmHg、温阻血0分群 (n=6)

III群：灌流圧80mmHg、温阻血30分群 (n=6)

動脈血流遮断後、30分間腹腔内に放置し、その後洗浄を行った。

IV群：灌流圧80mmHg、温阻血35分群 (n=8)

動脈血流遮断後、35分間腹腔内に放置し、その後洗浄を行った。

V群：灌流圧80mmHg、温阻血40分群 (n=6)

VI群：UW液内24時間冷却(4℃)保存群 (n=6)
他群と同様の操作で腎の剥離と、カニューレーションを施行し、腎動脈血流遮断直後から4℃に冷却したUW液内に単純浸漬し、24時間の保存後に灌流圧80mmHgで、12時間まで室温下灌流を行った。I~II群は、適切な灌流圧を決定すると共に、室温下灌流保存法の可能性の検討、およびIII~VI群のコントロールとして位置付けられるものである。また、III~VI群は、機能判定およびconditioningの可能性を検討するものとして位置付けられるものである。

【0045】④ 検査項目と測定方法

1) 灌流量：流量調節機能のあるローラーポンプ5 (MP-101、東京理科器械社製) の表示目盛による検量線グラフを作成し、流量を測定した。

2) 灌流圧：エアートラップ8に圧力計7 (最小目盛5mmHg、Aneroid Sphygmomanometer、NITIRIN社製、0~500mmHg) を設置して、連続的にモニターした。

3) 灌流液ガス分析 (pH、酸素分圧、炭酸ガス分圧)：全自動アナライザー (ABL-30、Radiomet社製) で測定した。

4) 2時間毎の尿量：容量20mlのメスシリンダー13 (Pyrex社製) を用いて測定した。

5) 尿pH、尿中電解質 (ナトリウム、カリウム値)：尿pHは全自動アナライザー (ABL-30) で、電解質は日立7150 (日立社製) で測定した。

6) 灌流前後の腎の重量変化：最小目盛1gの台式秤量計 (ヤマト社製) を用いて測定した。

7) 腎の病理組織学的検査：灌流終了時に、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色および酵素組織化学染色で観察した。後者は、アルカリフォスファターゼ (A1-P)、酸フォスファターゼ (Ac-P)、乳酸脱水素酵素 (LDH)、コハク酸脱水素酵素 (SDH)、γ-グルタミルトランスアミナーゼ (γ-GTP) について検討した。

なお、数値は全て平均値±SDで表し、有意差検定は、unpaired t test (個体数が異なる2群間の有意差検定法) にて行い、危険率5%以内を有意差ありとした。

【0046】〔結果〕

I群

初期灌流量は0.91±0.01ml/min/g腎であった。しかし、経過中に回路内圧の上昇により、最終的には0.31±0.27ml/min/g腎と約1/3に低下した。腎の重量変化は、平均19.2%増加した。5例中3例は、回路内圧の上昇により、12時間までの灌流が不可能となった。一方、利尿は回路内圧の上昇を契機に出現した。しかし、全例で利尿および回路内圧の調節が不良で、実験の継続は困難であった。

【0047】II群

初期流量は1.58±0.13ml/min/g腎であり、灌流中もほぼ一定の流量を維持した。灌流液のpHは、ほぼ設定値の7.40前後を示し、利尿の程度や保存状態により多少の変化はあるものの、最低で7.33ΔpH、最高で7.47ΔpHの範囲の変動に留まった。灌流液の酸素分圧は、465.8mmHgから850.0mmHgの間で変動したが、400mmHgを下回することはなかった。全例で灌流開始直後より透明な尿の流出を認め、全経過を通じて一定の利尿が認められた。尿のpHは6時間後に最低値の6.55±0.14ΔpHを示したが、以後漸増した。尿中ナトリウム値は、4時間後は最低の55.0±22.9mEq/Lで、以後漸増し、12時間目では113.7±21.7mEq/Lを示した。尿中カリウム値は、最初の2時間で50.5±6.4mEq/Lと最高値を示し、以後減少して、12時間目では19.3±9.0mEq/Lとなった。摘出腎の重量は、灌流開始直後で15~19gであり、6例中3例は重量変化なく、2例で増加、1例で減少した。平均重量増加率は+8.7±11.1%であった。組織学的変化をHE染色でみると、糸球体の構築は良好に保たれ、尿細管上皮にも扁平化や脱落の所見を認めなかった。また、酵素組織化学染色では、A1-P染色で、尿細管の胞体内に酵素反応が紫赤

色に濃染され、良好なviabilityを示した。これは他の酵素染色でも同様の所見を認めた。以上の成績は、6例全例を総括した成績である。しかし、この6例のうち1例は他の5例と比較して尿組成の変動が大幅に異なっていた。即ち、尿中ナトリウム値は、他の5例に比して全経過を通じて明らかに低値であった。また、尿中カリウム値も同様に高値であり、この傾向は尿pHについても同様であった。

【0048】III群

初期流量は 1.69 ± 0.20 ml/min/g腎であり、灌流中もほぼ一定の流量を維持した。終了時の流量は 1.72 ± 0.1 ml/min/g腎となった。灌流液のpHは $7.31 \sim 7.40$ ΔpHの間で変動した。灌流液の酸素分圧はII群と同様に 400 mmHgを下回することはなかった。また、炭酸ガス分圧は、 $2.4 \sim 6.1$ mmHgの間で変動した。全例で、開始後間もなく利尿を認め、II群と同様に全経過を通じて一定の利尿を認めた。尿pHは4時間目には最低値の 6.67 ± 0.13 ΔpHに達し、以後漸増した。尿中ナトリウム値は、4時間後に最低の 50.7 ± 10.7 mEq/Lで以後漸増し、12時間目では 122.0 ± 16.9 mEq/Lとなった。尿中カリウム値も4時間に最高値の 56.0 ± 7.7 mEq/Lとなり、以後漸減した。摘出腎の重量は、灌流開始直後で $11 \sim 19$ gであり、1例が灌流前後も変化なく、4例が増加、1例が減少した。平均の重量増加率は $9.2 \pm 9.2\%$ であった。HE染色では、糸球体・尿細管共にII群と同様、その構築は良好に保たれていたが、尿細管胞体の扁平化がわずかに認められた。酵素組織化学染色では、A1-P染色で、尿細管の胞体内の染色性はII群とほぼ同じであった。また、他の酵素染色も同様であった。

【0049】IV群

8例中2例で殆ど利尿を認めず、1例で利尿を認めたものの、尿組織が灌流液の組成とほぼ同じであったため、脱落例とし、5例について検討した。5例の初期流量は 1.85 ± 0.39 ml/min/g腎であり、全経過を通して良好な流量が得られた。灌流液のpHの12時間の変動は $7.23 \sim 7.41$ ΔpHと、II、III群に比してやや低くなる例があったが、大部分は 7.30 ΔpH以上で留まった。灌流液の酸素分圧は、 400 mmHgを下回る事はなかった。また、炭酸ガス分圧は $2.7 \sim 6.7$ mmHgと低値で経過した。5例は灌流後間もなく利尿を認めたが、流出量はII群に比較して少なくIII群とほぼ同じ傾向が認められた。尿pHは 6.88 ± 0.17 ΔpHであり、6時間まで徐々に低下し、 6.69 ± 0.14 ΔpHとなったが、以後上昇に転じ、12時間目では 6.91 ± 0.16 ΔpHであった。尿中ナトリウム値は、4時間後に最低の 76.2 ± 16.5 mEq/Lとなったが次第に増加し、12時間後は 117.0 ± 10.9 mEq/Lに達した。尿中カリウム値は最初の2時間で 42.6 ± 12.2 mEq/Lと最高値を示し、以後漸減し

た。摘出腎の重量は、不変が1例、増加が3例であり、減少したのは1例であった。平均の増加率は $13.2 \pm 11.3\%$ であった。III、IV群の成績ではいずれの値もII群との間に有意差はなかった。HE染色では、糸球体の構築は良好に保たれたが、III群と同様に、尿細管の胞体の扁平化が軽度認められた。また、上皮の脱落は認められなかった。酵素組織化学染色では、A1-P染色で、染色性が劣ったが、完全に失われた訳ではなかった。これは他の染色法でも同様の傾向であった。

【0050】V群

6例中3例では利尿不良で尿の各種組成は灌流液の組成に近かったため、分析には利尿が良好な3例についてのみ検討した。即ち、温阻血40分では、半数の腎が不可逆的な機能不全をきたした。良好例3例と不良例3例とを、灌流量で比較すると、初期流量では良好例が 1.92 ± 0.41 ml/min/g腎であったのに対して、不良例では 1.35 ± 0.14 ml/min/g腎と明らかに低下しており、終了時の流量は、前者で 1.81 ± 0.40 ml/min/g腎、後者で 1.51 ± 0.31 ml/min/g腎であった。利尿良好例3例では、灌流開始後間もなく利尿を認め、最初の2時間では 10.4 ± 5.6 mlであり、12時間の総尿量は 50.0 ± 13.1 mlに達し、むしろ他の群より多い傾向を認めた。良好例の尿pHは、 6.95 ± 0.22 ΔpHであり、6時間までは徐々に低下し 6.88 ± 0.15 ΔpHとなったが、以後上昇し、12時間目では 7.05 ± 0.07 ΔpHと 7.00 ΔpHを越えた。これは、II群と比べて有意($P < 0.05$)に高値であった。尿中ナトリウム値は、3例のばらつきが大きく、最初の2時間で 89.7 ± 44.4 mEq/Lであった。以後、4時間後に 86.3 ± 31.5 mEq/Lとやや回復の微をみせたものの、次第に上昇し、12時間後には、灌流液のナトリウム組成に近い 130.7 ± 17.6 mEq/Lとなった。即ち、尿細管の再吸収能の破綻が示唆された。尿中カリウム値は、最初の2時間で 35.7 ± 25.8 mEq/Lであり、4時間後まではほぼ一定に経過し、以後漸減して12時間後には 12.3 ± 7.6 mEq/Lに低下した。しかし、ナトリウム、カリウムいずれの値もばらつきが大きいため、II群とは有意差がなかった。比較的数字の良好な1例を除いての検定では5%の危険率で有意差を認めた。摘出腎の重量の変化は、不変が1例、増加が2例であり、平均の増加率は $7.7 \pm 5.6\%$ であった。良好例のHE染色では、糸球体の構築は良好に維持されており、尿細管は胞体の扁平化をわずかに認めるものの、全体の変化は軽微であった。一方、酵素組織化学染色のうちのA1-P染色では、その染色性は極めて不良で、尿細管の胞体内に淡く染まるのみで、細胞膜の維持機構の破綻が示された。

【0051】VI群

6例の初期流量は 2.88 ± 0.88 ml/min/g腎とII～V群に比べて非常に多かったが($P < 0.01$)、これ

は、24時間の浸漬保存中に腎が脱水により軽くなったため、計算上、流量が多くなったものである。従って、腎1個当たりの流量は、26~28ml/minであり、他の群とほぼ同じであった。また、終了時の流量は、逆に腎の重量が増加したために、 1.23 ± 0.20 ml/min/g腎と低流量になったが、腎1個当たりの流量は、初期の1個当たりの流量と変わらなかった。灌流液のpHは、7.28~7.42ΔpHの間で変動し、他の群と差は認められなかった。灌流液の酸素分圧は、400mmHgを下回ることにはなかった。また、炭酸ガス分圧も2.6~6.8mmHgと低い分圧で経過した。本群では、II~V群に比して尿量が多く、この傾向は全経過を通じて認められた($P < 0.05$)。尿pHは、 7.01 ± 0.10 ΔpHで、以後経時的に上昇し、12時間目には 7.21 ± 0.03 ΔpHであった。いずれもII群に比して有意に高値であった($P < 0.01$)。尿中ナトリウム値は、最初の2時間で 117.7 ± 20.2 meq/Lを示し、以後経時的に増加した。II群に比して有意($P < 0.01$)に高値であった。尿中カリウム値は、ナトリウム値と同様に、2時間値を最高値に経時的に低下した。II群に比して有意($P < 0.01$)に低値であった。摘出腎の重量変化は、極めて特徴的で6例全例が大幅に増加した。その増加率は、冷却保存前と常温灌流後間で $+61.6 \pm 36.1\%$ であり、冷却保存後の灌流直前と灌流後間で、 $154.7 \pm 110.4\%$ であった。これは24時間の冷却保存中に発現した脱水による重量減と、灌流中に出現する輸出入血管の著明な浮腫による重量の増加であった。HE染色では、糸球体は正常であり、一部に尿管細胞体の扁平化を認めるものの、全体としての構築は良く保たれていた。本群で特徴的なのは、輸出入血管の著明な浮腫状変化であり、これが灌流終了後の腎重量増加の重要な原因と考えられた。一方、酵素組織化学染色のA1-P染色では、II群に比して劣るものの、IV群とほぼ同等の染色性が保たれていた。

【0052】以上のI~VI群の実験結果から、以下のことがわかった。安定した酸素供給と基質の供給のため

に、80mmHgの灌流圧としたところ、12時間あるいはそれ以上の長時間保存の可能性が示された。利尿の程度、尿の色調、尿pH、尿中ナトリウム、カリウム値の簡便かつ迅速な検査法により、保存された腎のviability判定が可能であった。温阻血群の結果(尿pH、尿中ナトリウム、カリウム値の変動が4~6時間で最も良好な値を示した)から、本方法による障害腎のconditioningが可能であることが示唆され、家兎腎の温阻血限界は40分前後と考えられた。

【0053】実験例2

実施例1の灌流液を用い、以下に示す実験を行った。実験動物は、体重15~20kgの雄ブタ($n=5$)を用いた。麻酔および灌流液の酸素化は、実験例1に準じて行った。全麻下に開腹した後、門脈、肝動脈、肝上部および肝下部大静脈を遮断し、門脈よりチュービングして灌流した。肝下部大静脈にチュービングして灌流液を回収し、閉鎖回路として肝を灌流保存しながら、50%肝切除施行した。計2時間灌流した後、血流を再開した。下大静脈血、門脈血はバイオポンプで外腔静脈に返血した。血流再開30分後に肝生検を行ない、組織学的に検討した。また、実験終了直後、24時間後、48時間後に採血し、肝機能、凝固・線溶系因子の変動を検討した。その結果、全例において長期の生存が得られた。組織学的にはHE染色で肝の構築は保たれており、肝細胞にも異常を認めず、A1-P染色でも肝細胞の機能温存が証明された。T. Bil(血清総ビリルビン値)は0.5mg/dL以下で推移し、GOTは24時間後に最高値をとり(平均265)、GPTは観察期間中全て40以下であった。凝固・線溶系因子にも異常を認めなかった。以上より、肝切除時における本灌流法の肝保護の有用性が示された。

【図面の簡単な説明】

【図1】灌流回路の構成を示す概略図である。

【符号の説明】

2	灌流液
10	摘出腎(臓器)

【图1】

